

УДК 576.895.121 : 597.5

СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ  
В ПЕЧЕНИ НАЛИМА И КОЛЮШКИ  
ПРИ ИНВАЗИИ ПЛЕРОЦЕРКОИДАМИ ЦЕСТОД  
РОДА DIPHYLLOBOTRIUM

В. С. Сидоров, С. Д. Гурьянова

Институт биологии Карельского филиала АН СССР, Петрозаводск

В зараженной печени рыб по сравнению с незараженной уменьшается общее содержание свободных аминокислот, которое происходит в основном за счет незаменимых аминокислот, что, в свою очередь, резко изменяет процентное соотношение между отдельными аминокислотами. Особенно сильно, хотя и не пропорционально относительно друг друга, происходит снижение уровня лизина, аргинина, гистидина, треонина, валина, метионина и лейцинов.

Единственным источником незаменимых аминокислот для гельминтов является фонд свободных и связанных (белковых) аминокислот хозяина. Достаточно широко ведется изучение потребности гельминтов в различных аминокислотах и того воздействия, которое оказывают гельминты на содержание свободных аминокислот в хозяине (Павлов и др., 1970; Бердыева, 1972; Бердыева, Дрюченко, 1972; Шишова-Касаточкина, 1976; Senft, 1966, 1967; Guttowa, 1967, 1968; Fisher e. a., 1970; Feng e. a., 1970; Chappell, Read, 1973). По отношению к плоским червям, паразитирующим в тканях рыб, в частности по личиночным (плероцеркоиды) формам цестод, такие исследования отсутствуют. В то же время это представляет несомненно интерес как в плане понимания физиологических потребностей гельминта, так и для оценки того возможного вреда, который приносит паразит хозяину.

Частичному решению этого вопроса и посвящена настоящая работа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Проводили изучение содержания свободных аминокислот в печени налима *Lota lota* (L.) и колюшки *Gasterosteus aculeatus* (L.) в норме и при заражении плероцеркоидами *Diphyllobothrium vogeli* (колюшка) и *Diphyllobothrium latum* (налим). Чтобы уменьшить возможное влияние на аминокислотный состав других факторов, кроме заражения, для сравнения отбирали контрольную и зараженную рыбу с одинаковыми морфологическими, физиологическими и экологическими параметрами (размер, возраст, вес, стадия зрелости гонад, место и время отлова).

Рыбу отлавливали ставными неводами в мае 1972 и 1978 гг. в Онежском озере и Сямозере. Средний размер колюшки составлял  $6.1 \pm 0.6$  см, вес  $2.6 \pm 0.5$  г, стадия зрелости гонад — V. Незараженные экземпляры не содержали в печени плероцеркоидов *D. vogeli*; среди зараженных отбирали те особи, в печени которых имелось от 3 до 6 капсул. Средний размер взятых для анализа налимов составлял  $38.8 \pm 2.4$  см, вес был  $1.2 \pm 0.13$  кг, стадия зрелости гонад — III—IV. В качестве контроля отбирали рыб, не

имеющих плероцеркоидов *D. latum* в печени, а также не зараженных личинками *Triaenophorus nodulosus*, что в значительной степени затрудняло отбор материала, так как большая часть налимов была заражена обоими гельминтами. Из зараженных рыб отбирали те особи, которые имели от 5—10 экз. *D. latum* в печени. Кусочки зараженных тканей вырезали из участков, зараженных гельминтом, по 0.1—0.3 г от каждой рыбы. Средние пробы включали материал, отобранный от 25 рыб (4—5 г сырого материала). Ткани рыб измельчали и фиксировали 20-кратным количеством 96%-ного этилового спирта и хранили в течение месяца при 4°. Из фиксированного материала выделяли фракцию свободных аминокислот по методике Пасхиной (1959). Качественный и количественный анализы свободных аминокислот проводили методом двумерной бумажной хроматографии с использованием следующих растворителей: 1) н-бутанол—уксусная кислота—вода в соотношении 40 : 15 : 5 при трехкратной разгонке; 2) третичный бутанол—метилэтилкетон—вода—диэтиламин в соотношении 40 : 40 : 20 : 4 при двухкратной разгонке. Хроматограммы проявляли 0.5%-ным раствором никгидрина в ацетоне с последующим закреплением пятен аминокислот азотникислой медью. Идентификацию пятен аминокислот на хроматограммах проводили сравнением R<sub>f</sub> метчиков и опытных пятен аминокислот, полученных в идентичных условиях, а также по специфическим цветным реакциям на некоторые аминокислоты (Хайс, Мацек, 1962). Для количественного определения участки хроматограмм с соответствующими пятнами аминокислот вырезали равными по площади, измельчали и заливали 5 мл 75%-ного этилового спирта. После двухчасовой элюции окрашенный раствор колориметрировали при длине волны 540 мкм. Количество аминокислот рассчитывали по соотношению экстинций стандартного и исследуемого растворов с учетом диапазона концентраций, в которых сохранялась прямая пропорциональность между количеством окрашенных комплексов и интенсивностью окраски растворов. Полученные данные подвергали статистической обработке по Ивантеру (1971).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

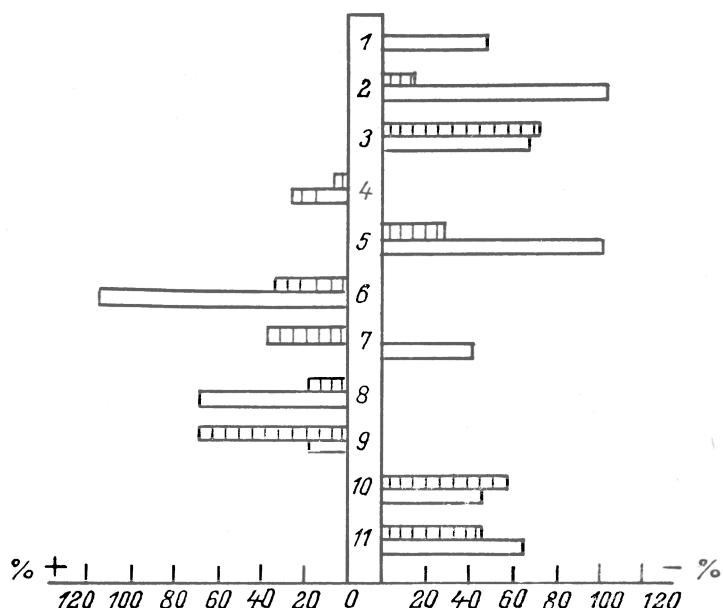
Из свободных аминокислот тканей рыб было обнаружено 18: цистин, цистеин, аргинин, лизин, гистидин, аспарагиновая кислота, глицин, серин, глутаминовая кислота, треонин, аланин, пролин, тирозин, валин, метионин, фенилаланин, лейцин и изолейцин. Качественные изменения в составе аминокислот зараженных тканей рыб по сравнению с незараженными отсутствовали, в то время как в количественном отношении они заметно отличались друг от друга. Изменение суммарного содержания свободных аминокислот и отдельных их групп в печени рыб показано в таблице. Как

Содержание свободных аминокислот в печени рыб, зараженных и не зараженных цестодами

Группа аминокислот	Колюшка		Налим	
	незараженная	зараженная *	незараженный	зараженный **
	n = 3	n = 8	n = 3	n = 6
Общие	3.0 ± 0.8	1.5 ± 0.4	2.5 ± 0.4	1.7 ± 0.6
Незаменимые	1.4 ± 0.3 46.7 ± 0.4	0.3 ± 0.1 26.9 ± 1.2	0.8 ± 0.1 38.3 ± 0.8	0.3 ± 0.1 29.1 ± 1.6
Заменимые	1.7 ± 0.5 53.3 ± 0.7	1.3 ± 0.2 73.1 ± 1.5	1.7 ± 0.3 61.7 ± 2.5	1.5 ± 0.4 70.9 ± 0.6

П р и м е ч а н и е. \* — инвазия плероцеркоидами *D. vogeli*. \*\* — инвазия плероцеркоидами *D. latum*. n — число проб; числитель — в процентах к сухому весу, знаменатель — в процентах к общему содержанию свободных аминокислот.

видно, инвазия гельминтами приводит к снижению не только общего уровня аминокислот в тканях зараженных рыб по сравнению с незараженными, но и к изменению соотношений между отдельными группами аминокислот. Так, в печени колюшки, зараженной плероцеркоидами *D. vogeli*, содержание свободных аминокислот сокращается почти в 2 раза по сравнению с незараженной тканью. Это происходит в основном за счет уменьшения суммарной концентрации незаменимых и частично заменимых аминокислот. Общее количество незаменимых аминокислот снижается почти в 4 раза, в основном за счет значительного уменьшения содержания аргинина и



Диаграмма, показывающая изменение содержания свободных аминокислот в зараженной печени рыб ( $\text{в}\%$ ) по сравнению с незараженной.

1 — фенилаланин; 2 — лейцин + изолейцин; 3 — валин + метионин; 4 — аланин; 5 — треонин; 6 — глутаминовая кислота; 7 — серин; 8 — глицин; 9 — аспарагиновая кислота; 10 — гистидин; 11 — аргинин + лизин. незаштрихованные столбики — печень колюшки, зараженная плероцеркоидами *D. vogeli*; заштрихованные — печень налима, зараженная плероцеркоидами *D. latum*.

лизина (на 61.3), изолейцина (на 70.0), лейцина (на 32.5), валина и метионина (на 67.1) и гистидина (на 44.4%) (см. рисунок). Концентрация треонина уменьшалась до следовых количеств. В группе заменимых аминокислот при незначительном изменении их общей суммы, уровень некоторых аминокислот изменяется в больших пределах. Содержание серина снижается на 40.0, а количество глутаминовой кислоты и глицина увеличивается довольно резко — на 112.5 и 99.0% соответственно.

У налима, зараженного плероцеркоидами *D. latum*, также происходило снижение содержания свободных аминокислот в печени (см. таблицу). Общее количество их в зараженной печени по сравнению с незараженной достоверно снизилось с 2.5 до 1.75 % на сухой вес, что обусловлено главным образом уменьшением суммы незаменимых аминокислот. При этом наиболее значительно снижается уровень валина и метионина (на 71.1), лизина и аргинина (на 40.3), гистидина (на 55.0%), а также треонина и лейцина на 28.0 и 14.5% соответственно (см. рисунок). В группе заменимых аминокислот при отсутствии достоверных изменений их общей суммы отмечаются различия в соотношении некоторых аминокислот по сравнению с таковыми тканей, свободных от инвазии. Количество тирозина снижается на 9.8%, а концентрация аспарагиновой и глутаминовой кислот, серина, глицина и аланина возрастает соответственно на 60.8, 33.3, 35.2, 7.4 и 4.8%.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными работ, в которых были четко показаны различные изменения соотношений между отдельными аминокислотами в зараженных тканях по сравнению с незараженными. Так, Зулькарнаев (1975) выявил наличие выраженных изменений фонда аминокислот крови и печени хомяков при экспериментальном дифиллоботриозе, причем их характер и величина зависила от длительности инвазии. У животных с двухмесячной инвазией наибольшие отклонения в сыворотке крови отмечались в группе незаменимых аминокислот. Так, содержание лизина, валина, суммы лейцина и изолецина снижалось по сравнению с контрольным уровнем на 33.0, 43.0, 68.0 % соответственно. Уменьшение количества свободных аминокислот было обнаружено и в зараженной trematodами пищеварительной железе и гонадах морских улиток (Roy, 1969; Porter, Jamble, 1971), а также в сыворотке крови лошадей под влиянием trematоды *Schistosoma mansoni*, причем особенно сильно при этом уменьшалось содержание незаменимых аминокислот — гистидина, аргинина и триптофана (Selim e. a., 1972). У интенсивно зараженных шистозомами мышей при более длительной инвазии уровень аргинина в сыворотке крови приближался к нулю (Senft, 1967).

Изменение фонда свободных аминокислот в тканях инвазированных рыб, по-видимому, является результатом утилизации их паразитами. Так, при сравнении аминокислотных соотношений плероцеркоидов *D. latum* и печени налима в тканях гельминта увеличено содержание незаменимых аминокислот (52.8) по сравнению с тканью хозяина (29.1 % к сумме всех кислот). Соответствующие данные, правда, по отношению к другой группе гельминтов (нematод) были получены советскими авторами (Бердыева, 1972; Бердыева, Дрюченко, 1972; Павлов и др., 1970), которые показали избирательное поглощение нематодами из культуральных растворов незаменимых аминокислот — аргинина, лизина и гистидина, что объясняется высокой физиологической потребностью этих паразитов именно в данных аминокислотах (для построения кутикулы, образования гистонов, содержащихся в большом количестве в половых продуктах и т. д.). Однако не совсем еще ясными представляются возможные механизмы, приводящие к преимущественному уменьшению в тканях рыб незаменимых аминокислот. Вызвано ли это тем, что гельминт избирательно поглощает в первую очередь незаменимые аминокислоты или это, скорее, связано с неспособностью клетки компенсировать потерю незаменимых аминокислот с такой же скоростью, с какой это происходит в отношении заменимых (учитывая внутриклеточный синтез последних)? Первую точку зрения подтверждают работы английских исследователей, в которых они показали избирательное поглощение отдельных экзогенных аминокислот при инкубации ленточного червя *Hymenolepis diminuta* в искусственных культуральных условиях (Chappell, Read, 1973).

Кроме того, изменение соотношений между отдельными аминокислотами в тканях инвазированных животных может играть и защитную роль для хозяина. Так, присутствие личинок *Triaenophorus nodulosus* в полости тела копепод вызывало значительное изменение в составе свободных аминокислот целомической жидкости. Уменьшалось количество лизина, аспарагиновой кислоты и ароматических аминокислот, а также значительно увеличивалось содержание пролина и метионина (Guttowa, 1967, 1968). Автор считает, что увеличение синтеза метионина копеподами служит для метилирования токсических веществ, выделяемых паразитом. С другой стороны, увеличение количества некоторых аминокислот в тканях инвазированных животных может привести к изменению необходимого соотношения аминокислот, определяющего интенсивность биосинтеза белка у хозяина (Hopkins, Callow, 1965).

Уменьшение содержания некоторых аминокислот, особенно незаменимых, в тканях инвазированных рыб, может оказаться не только на биосинтезе белков, но и на ряде метаболитических процессов в организме рыб, в частности на синтезе некоторых биологически активных веществ

(ансерина, гистамина, креатина и др.), на метилирующей активности (метионин) и активности орнитинового цикла (аргинин), а также несколько снижать осмотическое давление в клетке и активизировать работу внутриклеточных протеаз (катепсинов и др.), что может привести к нарушению гомеостаза клетки.

#### Л и т е р а т у р а

- Б е р д ы е в а Г. Т. Поглощение аминокислот аскаридиями при содержании их в различных аминокислотных средах. — Изв. АН ТССР. Сер. биол., 1972, вып. 5, с. 74—77.
- Б е р д ы е в а Г. Т., Д р ю ч е н к о Е. А. Потребление *Ascaris suum* аминокислот из полноценных и неполноценных смесей аминокислот. — Изв. АН ТССР. Сер. биол., 1972, вып. 3, с. 28—31.
- З у лька р на е в Т. Р. Некоторые особенности белкового обмена при экспериментальном дифиллоботриозе. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1975, вып. 1, с. 78—82.
- И в а н т е р З. В. Элементарная биометрия. Петрозаводск, 1971. 64 с.
- П а в л о в А. В., Ш и ш о в а - К а с а т о ч к и н а О. А., В о лын с к а я К. Б. О транспорте аминокислот у нематод. — Паразитология, 1970, т. 4, вып. 3, с. 231—235.
- П а с х и н а Т. С. Количественное определение аминокислот на хроматограммах при помощи реакции с нингидрином. — Биохимия, 1954, т. 19, вып. 6, с. 54—59.
- Ш и ш о в а - К а с а т о ч к и н а О. А. Исследование белкового обмена у гельминтов. — Тр. ГЕЛАН, 1972, т. 26, с. 196—209.
- Х айс И. М., М а ц е к К. Хроматография на бумаге. М., 1962. 851 с.
- С h a r p e l l L. H., R e a d C. P. Studies on the free pool of amino acid of the Cestode *Hymenolepis diminuta*. — Parasitology, 1973, vol. 67, N 3, p. 289—305.
- F i s h e r R. C., G o n e s a l i n d a m V. K. Changes in the composition of host haemolymph after attack by an insect parasitoid. — Nature, 1970, vol. 227, N 5254, p. 191—192.
- F e n g S. Y., K h a i r a l l a h E. A., C a n z o n i e r W. G. Hemolymph — free amino acid and related nitrogenous compound of *Crassostrea virginica* infected with *Bucephalus* sp. and *Minchinia nelsoni*. — Comp. Biochem. and Physiol., 1970, vol. 34, N 3, p. 547—556.
- G u t t o w a A. Influence of *Triaenophorus nodulosus* (Pall) (Cestoda) larva on the quantitative occurrence of amino acid in haemolymph of *Eudiaptomus gracilis* (Sars) (Copepoda) — In: Polish Parasitol. Soc. 9th meeting, 1967, p. 48—56.
- G u t t o w a A. Amino acid in the tissues of procercoïd of *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda) and in the coelomic fluids of their host, *Eudiaptomus gracilis* (Copepoda) before and after infection. — Acta Parasitol. Pol., 1968, vol. 15, p. 224—228.
- H o r p k i n s C. A., C a l l o w L. L. Methionine flux between a tapeworm (*Hymenolepis diminuta*) and its environment. — Parasitology, 1965, vol. 55, N 4, p. 653—666.
- P o r t e r C. A., J a m b l e W. Free amino acids content of the healthy and parasitized digestive gland of *Oxytrema silicula* and the rediae of *Nanophytes salmincola*. — Comp. Biochem. and Physiol., 1971, vol. 40, N 2, p. 335—340.
- R o y R. J. Qualitative and quantitative estimations of the free amino acid in a gonad of *Littorina saxatilis tenebrosa* (Mont) and in the daughter sporocysts of *Microphallus pygmaeus* (Levinsen, 1881) and *Microphallus similis* (Jagerskiold, 1900) (Trematoda: Microphallidae). — Compar. Biochem. and Physiol., 1969, vol. 31, N 4, p. 655—665.
- S e l i m A. S. M., S a b e r M. A., M o u s a A. H. A study on the changes in the amino acid composition of horse serum medium maintaining adult *Schistosoma mansoni* worms. — Egypt J. Chem., 1972, vol. 15, N 3, p. 233—246.
- S e n f t A. W. Studies in arginine metabolism by schistosomes. — Comp. Biochem. and Physiol., 1966, vol. 18, p. 209—216.
- S e n f t A. W. Studies in arginine metabolism by schistosomes. — Comp. Biochem. and Physiol., 1967, vol. 21, N 2, p. 299—306.

THE CONTENT OF FREE AMINO ACIDS IN THE LIVER OF BURBOT  
AND STICKLEBACK AT THE INFECTION WITH PLEROCERCIDS OF CESTODES  
OF THE GENUS DIPHYLLOBOTHRIUM

V. S. Sidorov, S. D. Gurjanova

S U M M A R Y

The total content of free amino acids in the liver of fishes infected with plerocercoids of *D. vogeli* and *D. latum* decreases as compared to that of an uninfected one that proceeds mainly on account of irreplaceable amino acids. This changes in its turn the percent ration between individual amino acids. Especially intensively, though not proportionally to each other, proceeds the fall of the level of lysine, arginine, histidine, threonine, valine, methionine and leucine.